

ALESSANDRA DALLÓ MARTINS

**MICROENCAPSULAÇÃO E ESTUDO DE LIBERAÇÃO DO
CORANTE NATURAL CARMIM DE COCHONILHA**

Florianópolis – SC
2006

ALESSANDRA DALLÓ MARTINS

**MICROENCAPSULAÇÃO E ESTUDO DE LIBERAÇÃO DO
CORANTE NATURAL CARMIM DE COCHONILHA**

Relatório apresentado ao Curso de Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, para a obtenção da aprovação na disciplina QMC5510–Estágio Supervisionado sob orientação da Prof^a. Dra. Tereza Cristina Rozzone de Souza.

Florianópolis – SC
2006

"Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estivermos possuídos de uma inabalável determinação, conseguimos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."

(Dalai - Lama)

AGRADECIMENTOS

De forma muito especial aos meus alicerces: minha mãe Sandra e meu pai César, pelo apoio em todos os momentos em que estive ausente, nos momentos mais difíceis me dando forças para continuar e principalmente pela amizade e carinho recebido na construção de um sonho. Amo vocês.

Aos meus irmãos Andressa e Anderson. Obrigada pelo amor, carinho e amizade. A vida sempre me ensinou que a melhor coisa é sempre poder contar com pessoas que façam sentirmos que somos vencedores e sempre da melhor forma souberam mesmo de longe como me apoiar.

Ao meu grande amor: Moacir, pelo seu companheirismo, amor, paciência e por todo tempo que você disponibilizou para mim. Eu te amo.

A minha família que sempre me apoiou e me deu forças.

A Prof^a Dr^a Tereza Cristina Rozone de Souza pela amizade e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

A todo o grupo QUITTECH, e em especial ao Alexandre pela amizade e apoio.

Aos meus amigos, em especial a Ana Cristina, a Lidiane e ao Lourenço que estiveram comigo durante a graduação e tornaram todos os momentos especiais.

A Deus que me faz feliz todos os dias.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS e ABREVIATURAS	10
1. RESUMO	11
2. INTRODUÇÃO	12
2.1 Revisão Bibliográfica	12
2.2 Justificativa do Trabalho	20
2.3 Objetivos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Materiais	22
3.2 Métodos	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Determinação do Grau de Desacetilação da Quitosana	28
4.2 Espectro UV-Visível para o Corante Carmim de Cochonilha	29
4.3 Dependência do pH na Adsorção do Corante Carmim de Cochonilha.....	30
4.4 Caracterização das Microesferas por Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	31
4.5 Análise da Morfologia das Microesferas Utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	33
4.6 Análise Termogravimétrica (TGA) das amostras de Microesferas de Quitosana	34
4.7 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) das Amostras de Microesferas de Quitosana	36
4.8 Estudo de Liberação Controlada do Corante Carmim de Cochonilha em Função do pH.....	37
4.9 Determinação do Grau de Intumescimento (GI).....	39
4.10 Análise do Mecanismo de Liberação para o Corante Carmim de Cochonilha a partir de Microesferas de Quitosana	40

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do ácido carmínico.....	14
Figura 2 - Estrutura química da quitina (a) e da quitosana (b).....	18
Figura 3 - Curva de titulação condutimétrica da quitosana.....	28
Figura 4 - Espectro de UV-VIS para o corante carmim de cochonilha em soluções: a) ácida, b) aquosa e c) básica.....	29
Figura 5 - Dependência do pH para a adsorção do corante carmim de cochonilha, utilizando microesferas de quitosana.....	30
Figura 6 - Espectro de infravermelho, utilizando-se pastilhas de KBr: a) corante, b) coacervada, c) impregnada e d) quitosana.....	32
Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura das microesferas: a) população de microesferas de quitosana; b) microesfera de quitosana; c) população de microesfera de quitosana impregnada e d) microesfera de quitosana coacervada.....	33
Figura 8 - Secções transversais na microesferas de quitosana contendo o corante carmim de cochonilha: a) impregnada e b) coacervada.....	34
Figura 9 - Análise de TGA para as microesferas: a) quitosana, b) impregnada e c) coacervada.....	35
Figura 10 - Análise de DSC para a microesfera: a) quitosana, b) impregnada, c) coacervada e d) corante.....	36
Figura 11 - Perfil de liberação do corante carmim de cochonilha para as microesferas impregnadas a 25°C: (■) pH = 1,0; (●) pH = 2,0; (▲) pH = 3,0; (▼) pH = 4,0 e (◆) pH = 5,0.....	38
Figura 12 - Perfil de liberação do corante carmim de cochonilha para microesferas coacervadas a 25°C: (■) pH = 1,0; (■) pH = 2,0; (■) pH = 3,0; (■) pH = 4,0 e (■) pH = 5,0.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grau de intumescimento das diferentes amostras de microesferas de quitosana contendo corante carmim de cochonilha.....	40
Tabela 2 - Coeficiente difusional n para a liberação do corante carmim de cochonilha a partir de microesferas de quitosana impregnadas e coacervadas....	41

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Determinação da quantidade de corante adsorvido nas microesferas..	23
Equação 2. Determinação do Grau de Intumescimento.....	27
Equação 3. Determinação do Grau de Desacetilação.....	29
Equação 4. Equação para analisar o processo de liberação de solutos a partir de matriz polimérica.....	41

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS e ABREVIATURAS

%GD	Grau de desacetilação da quitosana
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo de absorção
C_e	Concentração de corante em equilíbrio na solução (mg/L)
C_o	Concentração inicial de corante na solução (mg/L)
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
GI	Grau de intumescimento
IV	Espectroscopia no infravermelho
k'	Constante relatada para as propriedades do sistema de liberação
k	Condutância (mS/cm)
M	Unidade de concentração: Molaridade (mol.L^{-1})
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
M_t	Quantidade de corante liberado no tempo t
M_f	Quantidade de corante total liberado
n	Coeficiente utilizado para propor o mecanismo de liberação de solutos a partir de matriz polimérica
T	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Q	Quantidade de corante adsorvido no polímero (mg/g)
$q_{\text{máx}}$	Capacidade máxima de adsorção (mg/g)
TGA	Análise termogravimétrica
V	Volume (L)
V_1	Volume de NaOH empregado para atingir o 1º ponto de equivalência na obtenção do %GD
V_2	Volume de NaOH empregado para atingir o 2º ponto de equivalência na obtenção do %GD
W	Massa de microesferas de quitosana (mg)
W_{∞}	Massa das microesferas no tempo zero (estado seco) no estudo do grau de intumescimento
W_t	Massa das microesferas no tempo t no estudo do grau de intumescimento

1. RESUMO

A pigmentação de alimentos é uma prática freqüentemente usada na indústria para reparar a cor perdida no processamento ou para aperfeiçoar o aspecto do produto. Nos últimos anos a tendência é substituir os corantes artificiais com o seu equivalente natural, para os quais novos corantes são pesquisados.

O ácido carmínico é proveniente do inseto *Dactylopius coccus* Costa, um parasita dos caules de cactos; cujas fêmeas são a única fonte de ácido carmínico, um corante vermelho, solúvel em água e não tóxico. O ácido carmínico é um dos aditivos aprovados pela legislação como um corante natural para o uso em alimentos.

Atualmente para conferir estabilidade, melhorar a solubilidade e facilitar o manuseio dos corantes naturais tem-se utilizado a tecnologia de microencapsulação. A microencapsulação é uma técnica de imobilização de sólidos, gotículas de líquido ou material gasoso, em partículas denominadas microesferas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidade e condições específicas.

Este trabalho objetiva o estudo da estabilidade do corante natural carmim de cochonilha microencapsulado em matriz polimérica de quitosana. A partir da quitosana, foram obtidas microesferas, pelo método de separação de fases ou coacervação simples. A microencapsulação do corante natural carmim de cochonilha foi realizada pelos métodos de impregnação e coacervação. As amostras foram caracterizadas por: IV, MEV, TGA e DSC sendo que, tais técnicas comprovam a eficiência dos métodos empregados no preparo das amostras. As análises de MEV apresentaram as microesferas sem poros ou fissuras garantindo, desta forma, a preservação das características do corante. A cinética de liberação em diferentes pH indicou que conforme há um aumento de pH a liberação torna-se mais lenta, além de ser observado, que a amostra coacervada apresentou maior velocidade de liberação do corante. Os estudos cinéticos indicam para as amostras um mecanismo de liberação do corante do tipo super Caso II de transporte.

2. INTRODUÇÃO

2.1 Revisão Bibliográfica

A aceitação do produto alimentício pelo consumidor está diretamente relacionada à sua cor. Esta característica sensorial, embora subjetiva, é fundamental na indução da sensação global resultante de outras características como o aroma, o sabor e a textura dos alimentos. Desta forma, a aparência do alimento pode exercer efeito estimulante ou inibidor do apetite. Por essa razão, o setor alimentício preocupa-se tanto com a aplicação de cores e obtenção de alimentos que agradem aos olhos do consumidor (COLLINS e PLUMBLY, 1995; FREUND et al., 1988).

Os corantes são adicionados aos alimentos com a finalidade de conferir, intensificar e/ou padronizar a coloração dos produtos alimentícios, proporcionando as mesmas características de um produto natural. Eles são usados para restaurar possíveis perdas que ocorrem durante a produção e armazenamento, para manter a uniformidade do produto e atender as expectativas dos consumidores (CONSTANT et al., 2002).

A tendência mundial é, cada vez mais, reduzir o uso dos corantes artificiais devido aos possíveis danos que podem provocar a saúde dos consumidores. Apesar de apresentarem menores custos de produção, fornecerem ampla gama de cores, alta estabilidade (luz, oxigênio, calor e pH), uniformidade na cor conferida e alto poder tintorial, sua substituição por corantes naturais tem sido gradativa. A substituição enfrenta dificuldades em virtude de questões relacionadas com a estabilidade, principalmente, nas condições de processamento e armazenamento dos alimentos. Neste sentido, as indústrias de corantes naturais têm investido em estudos e pesquisas para melhorar a estabilidade à luz, calor e outros fatores que reduzem as possibilidades de aplicações dos corantes naturais, a fim de torná-los tão estáveis quanto os artificiais, mas com a vantagem de não apresentarem possíveis reações adversas, como vem sendo estudado nos corantes artificiais, principalmente no caso do amarelo tartrazina. Os corantes naturais são encontrados em várias tonalidades e com a mistura deles é possível

obter uma gama de cores tão grande quanto as possíveis com os artificiais.

Com a finalidade de tornar os corantes naturais mais competitivos, observa-se nas últimas décadas, que as pesquisas estão voltadas muito mais para os corantes naturais e estão direcionadas desde para a descoberta de novos pigmentos, assim como para o estudo da estabilidade e aplicabilidade destes pigmentos em alimentos industrializados (DAMASCENO, 1988; FRANCIS, 1989; SHAHIDI & HAN, 1995; STRINGHETA, 1999).

Os pigmentos naturais em alimentos são derivados de diversas substâncias: i) substâncias fenólicas e produtos de sua oxidação; ii) derivados de porfirinas, como grupo heme e clorofilas; iii) pigmentos escuros produzidos enzimaticamente ou não-enzimaticamente; complexos de metais pesados com proteínas ou compostos fenólicos; v) carotenóides e pigmentos relacionados (POTHAKAMURY, 1995). Os corantes naturais mais comuns são: o carmim de cochonilha, urucum e cúrcuma.

Dentro do contexto dos corantes naturais o carmim é um dos mais consumidos no mundo, por sua versatilidade e boa estabilidade ao calor. É um corante de coloração vermelha, cujo pigmento de ácido carmínico é extraído a partir de fêmeas dessecadas de insetos da espécie *Dactylopius coccus* Costa ou Cochonilha.

O termo carmim é usado, mundialmente, para descrever complexos formados a partir do alumínio e ácido carmínico. O termo cochonilha é empregado para descrever tanto os insetos desidratados como o corante derivado deles. Muitas espécies desses insetos têm sido usadas como fonte de corantes vermelhos. Cada inseto é associado com uma planta hospedeira particular gerando cores características, no entanto, a Cochonilha Americana é a única com expressividade comercial. Na realidade, a principal origem desses insetos é peruana. Cerca de 300 toneladas de cochonilha na forma dessecada é produzida anualmente (HENRY, 1996).

A cochonilha é de extrema importância para economia peruana, não apenas pelo seu valor comercial, mas também pelos empregos gerados em todo sistema desde a criação do inseto até a obtenção do corante (SCHUL, 2000). O

ácido carmínico é o principal constituinte da cochonilha (responsável pelo poder tintorial do corante), sendo considerado um composto toxicologicamente seguro para ser utilizado em alimentos (FRANCIS, 1996).

Quimicamente o ácido carmínico é um composto orgânico derivado da antraquinona, especificamente uma hidroxiantraquinona ligada a uma unidade de glicose, cuja estereoquímica foi recentemente definida (Figura 1). Sua nomenclatura oficial é ácido 7-D-glucopiranosil-9,10-dihidroxi-3,5,6,8-tetrahidroxi-1-metil-9,10-dioxi-2-antraceno-carboxílico ($C_{22}H_{20}O_{13}$), peso molecular= 492,39 (HENRY, 1996). Este glicosídeo de antraquinona era utilizado como um inseticida potente contra as formigas (EISNER et al. 1994).

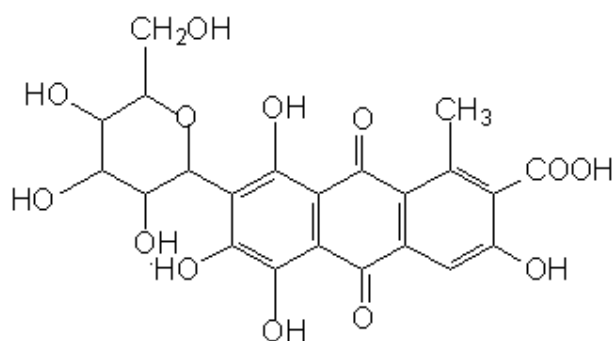


Figura 1 – Estrutura química do ácido carmínico

As hidroxiantraquinonas atraem a atenção de muitos pesquisadores devido a sua grande lista de possíveis aplicações relatadas para sua interessante fotoatividade. A maioria das aplicações é baseada em suas propriedades aromáticas. Suas cores dependem da posição e do número de hidroxilas presentes em sua estrutura (MILIANE, ROMANI & FAVARO, 2000). A presença de anéis aromáticos nestes compostos torna-os excelentes cromóforos, absorvendo considerável quantidade de luz visível.

O ácido carmínico é solúvel em água e a sua coloração depende do pH do meio. Em pH ácido adquire a cor laranja, tornando-se vermelho na faixa de 5,0 a 7,0 e azul na região alcalina. Graças à habilidade do ácido carmínico de complexar com certos metais, como o alumínio, obtém-se o corante carmin. As lacas de alumínio, como são conhecidos tais complexos, apresentam maior

intensidade de coloração que o ácido carmínico, solubilidade em soluções alcalinas, sendo pouco solúveis em soluções ácidas. Diferentemente do ácido carmínico sua coloração pouco se altera com as variações de pH do meio (é vermelha em pH 4 e muda para azul apenas em torno de pH 10) (FRANCIS, 1999). A baixa solubilidade em pH reduzido é a única limitação técnica para o seu emprego.

O carmim é considerado bastante estável ao calor e a luz e resistente a oxidação. Sendo assim aplicado em alguns tipos de conservas, gelatinas, sorvetes, produtos lácteos e sobremesas diversas.

Muitos estudos sobre fontes, extração e estabilidade de corantes naturais têm sido efetuados com o intuito de permitir sua utilização em detrimento dos artificiais. A importância que os corantes naturais vêm assumindo deve-se não só à tendência mundial de consumo de produtos naturais, mas também às propriedades funcionais atribuídas a alguns desses pigmentos (ARUONA, 2003). Assim, o desenvolvimento de novas pesquisas é estimulado com o intuito de superar as limitações tecnológicas existentes. Neste sentido, surgem a cada dia novas tecnologias entre as quais se destaca a microencapsulação.

A microencapsulação pode ser definida como um processo no qual uma membrana envolve pequenas partículas de sólido, líquido ou gás com o objetivo de proteger o material das condições adversas do meio, tais como luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos, estabilizando o produto, aumentando a vida útil e promovendo a liberação controlada do encapsulante em condições pré-estabelecidas (SHAHIDI & HAN, 1993). Na indústria de alimentos, a história da microencapsulação inicia-se aproximadamente no ano de 1951, quando Griffin patenteou um processo para a preparação de concentrados de óleo (GRIFFIN, 1951). Hoje, a microencapsulação é usada intensamente em muitos campos, incluindo processamento de alimento, agricultura, medicina e área farmacêutica (DEASY, 1984; SHAHIDI & HAN, 1993; HANAFI et al., 2000). As microesferas podem ter vários tamanhos (0,2 – 5.000 μm) dependendo do material e do método utilizado para prepará-las. Quanto à forma, as cápsulas são idealmente esféricas, embora seu formato possa ser influenciado pela estrutura original do ingrediente

encapsulado e pelo método de encapsulação empregando (BAKAN, 1973; KING 1995; DZIEZAK, 1998).

No processo de microencapsulação, o material a ser encapsulado, recebe várias denominações, tais como: núcleo, ingrediente encapsulado e ingrediente ativo. O material que forma o revestimento é denominado por: material de parede, carregador, membrana, casca, revestimento ou agente encapsulante (RISH, 1995).

As principais aplicações incluem produtos relacionados com a reprodução de imagem (impressão térmica e tornes para fotocópias), produtos agroquímicos (herbicidas, repelentes e pesticidas), produtos farmacêuticos para consumo oral ou injetável, cosméticos, ingredientes alimentícios, adesivos e encapsulantes de células vivas (incluindo enzimas e microorganismos) (SHAHIDI & HAN, 1993; SANTOS et al., 2000). Com relação aos corantes naturais, a técnica de microencapsulação pode ser utilizada visando melhorar a solubilidade, facilitar o manuseio e aumentar a estabilidade.

A finalidade básica da microencapsulação na indústria é proteger os ingredientes encapsulados. Deste modo, a microesfera sempre é projetada para liberar o conteúdo lentamente, isto é, com o passar do tempo ou até que certa condição físico-química seja alcançada (SANTOS et al., 2000).

A microencapsulação objetiva promover as seguintes ações a um material, de modo que ele mantenha a sua eficiência reativa em relação ao meio externo:

- i) Proteção contra luz, umidade e oxigênio;
- ii) Redução da taxa de transferência de massa;
- iii) Fácil manipulação do núcleo através da diminuição da higroscopicidade, de modo a manter: o escoamento constante, posicionamento do núcleo mais uniforme em uma mistura em função de seu diâmetro, quando usado em pequenas quantidades e manutenção da integridade da estrutura;
- iv) Liberação controlada e gradativa sob condições de pH, calor entre outros:

- v) Facilidade de manuseio e estocagem do ingrediente líquido, e retenção de compostos voláteis de sabor e aroma, para liberação sob condições pré-definidas (DZIEZAK, 1988; ENGELHARDT et al., 1988).

O encapsulante ideal além de proporcionar máxima proteção ao material ativo contra as condições adversas deve ter solubilidade em água e não possuir sabor desagradável, no caso de consumo oral. A escolha do encapsulante dependerá das propriedades químicas e físicas do ingrediente encapsulado, do processo utilizado para formar microesferas e das propriedades desejadas (DZIEZAK, 1988).

Teoricamente, qualquer material que necessite ser protegido, isolado ou lentamente liberado pode ser encapsulado. Atualmente, existem diversos métodos de encapsulação (KING, 1995; BENITA, 1996), entre os quais se destaca os métodos de coacervação e impregnação empregados neste trabalho.

A coacervação é considerada o método original e verdadeiro de encapsulação (DZIEZAK, 1988; RISH, 1995). O processo de coacervação consiste na dissolução do polímero para a obtenção de uma solução, na qual se pode adicionar um soluto qualquer, para posterior precipitação (SINHA et al., 2004). É considerada uma tecnologia em potencial para a microencapsulação de flavorizantes (DZIEZAK, 1988).

A adsorção de corante nas microesferas (impregnação) é um processo que envolve o contato de uma fase aquosa contendo o soluto livre com uma fase particulada rígida que esteja propenso a remover ou estocar, seletivamente, um ou mais solutos presentes na solução (ATKINS, 1993). Vários são os adsorventes citados na literatura, dentre eles: o carvão ativo, a turfa, a quitina, a sílica e mais recentemente a quitosana (RAO & ASHUTOSH, 1994; CHIOU & LI, 2002; RAMAKRISHNA & VIRARAGHAVAN, 1997).

A quitosana tem sido amplamente utilizada como adsorvente por possuir em sua cadeia polimérica um alto conteúdo de grupos amino e hidroxila, mostrando um alto potencial para adsorção de corantes, íons metálicos e

proteínas (SANFORD & HUTCHINGS, 1997; CHIOU & LI, 2002; WU et al., 2001a; ZENG & RUCKENSTEIN, 1998; GUIBAL, 2004).

A quitosana (Figura 2b) é um biopolímero natural obtido da desacetilação alcalina da quitina (MUZZARELLI, 1977; ROBERTS, 1992). A quitina (Figura 2a) é o componente principal da cutícula protetora dos crustáceos como caranguejos, camarões grandes, lagostas e de alguns fungos (FUKUDA, 1980).

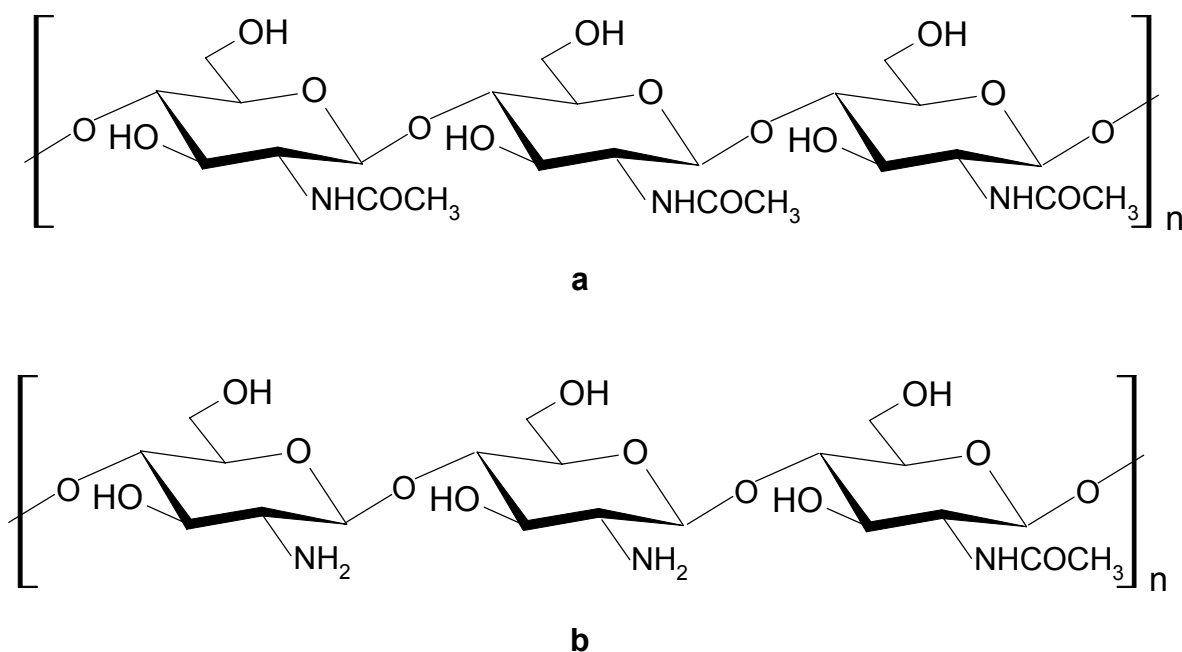


Figura 2 – Estrutura química da quitina (a) e da quitosana (b).

A quitosana é composta principalmente de glicosaminas, 2-amino-2-desoxi- β -D-glicopirranose, podendo ainda conter unidades de glicosamina acetilada. Desta forma, qualquer polímero quitina que possua um grau de desacetilação maior que 60%, já pode ser considerado quitosana (TAN et al., 1998). A quitosana possui três grupos funcionais reativos: um grupo amino, um grupo hidroxila primário e um grupo hidroxila secundário, localizados nas posições C-2, C-6 e C-3 respectivamente, na cadeia polimérica (SHAHIDI et al., 1999).

A quitosana é uma base fraca, pouco solúvel na água e solventes orgânicos, entretanto, é solúvel em soluções aquosas diluídas ácidas ($\text{pH} < 6.5$) (CHANDY & SHARMA, 1990).

Comercialmente, a quitosana está disponível na forma de flocos secos, em solução, ou pó fino. Tem um peso molecular médio entre 3800 a 2.000.000 e é 66 - 95% desacetilada (KAS, 1997). A não toxicidade, a biodegradabilidade e as propriedades biocompatíveis fazem da quitosana um biopoliímero em potencial para muitas aplicações biotecnológicas (MILES 1992; PEPPAS, 1992).

O caráter catiônico mais a presença de grupos funcionais reativos na quitosana fornecem as possibilidades para a sua utilização na tecnologia de liberação controlada (BRANNONN-PEPPAS, 1993).

A liberação controlada pode ser considerada um método pelo qual um ou mais ingredientes encapsulados são disponibilizados em períodos de tempos específicos. Uma das vantagens da liberação controlada é que o ingrediente ativo é liberado durante períodos de tempos prolongados e controlados (DZIEZAK, 1988). Realizada de forma adequada, a liberação controlada é uma das mais importantes propriedades da microencapsulação. Uma variedade de mecanismos de liberação controlada tem sido proposto para a liberação de ingredientes ativos a partir de uma matriz polimérica (SHAHIDI & HAN, 1993; WHORTON & REINECCIUS, 1995), sendo os principais:

- i) Fratura;
- ii) Difusão;
- iii) Dissolução ou fusão;
- iv) Biodegradação.

2.2 Justificativa do Trabalho

Na indústria alimentícia são usados corantes de origem sintética, mas sucessivas restrições determinadas pela legislação (FAO/WHO, FDA e Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil), estão contribuindo para estimular a pesquisa de novos corantes naturais e não tóxicos.

Este assunto tem como direção o crescente interesse pelos corantes naturais como os substituintes dos corantes sintéticos, devido as suas propriedades, considerando especialmente seus benefícios efetivos sobre o sistema biológico.

Atualmente, observa-se o interesse por pesquisas em fontes de extração, estabilidade e rendimento de corantes naturais, não só para aplicação na indústria de alimentos, como também na indústria de cosméticos, farmacêutica, têxtil, celulose, isto devido as suas potencialidade e características e com a finalidade de tornar os corantes naturais mais competitivos.

É desejável para muitas aplicações que os corantes naturais sejam dispersíveis em água. Isto é importante para utilizar seu poder de coloração, por exemplo, em diversos gêneros alimentícios. Hoje estudos estão sendo feitos para proteger os corantes instáveis por microencapsulação. Ao mesmo tempo a microencapsulação é desejável para tornar os corantes dispersíveis em água.

Houve na última década um grande progresso no desenvolvimento de ingredientes microencapsulados. Os estudos encontram-se avançados em relação ao aroma, mas ainda limitados em termos de corante.

Neste trabalho avaliamos o processo de microencapsulação do corante natural carmim de cochonilha, utilizando como agente encapsulante o biopolímero quitosana, a fim de melhorar sua solubilidade em solução aquosa ácida.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a eficiência do biopolímero quitosana como agente encapsulante do corante natural carmim de cochonilha, bem como avaliar a liberação do corante a partir dos produtos microencapsulados, e sua estabilidade.

2.3.2 Objetivos Específicos

- i) Caracterizar o biopolímero quitosana através da porcentagem de grupos amino (%GD);
- ii) Preparar microesferas de quitosana, pelo método de separação de fases ou coacervação simples;
- iii) Encapsular o corante carmim de cochonilha em matriz polimérica de quitosana pelos métodos de: impregnação e coacervação;
- iv) Estudar a morfologia do material formado entre o encapsulante e o ingrediente encapsulado, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- v) Caracterizar as microesferas de quitosana contendo o corante através de espectroscopia de infravermelho (IV), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC);
- vi) Determinar o grau de intumescimento das microesferas contendo o corante;
- vii) Analisar as cinéticas de liberação do corante microencapsulado em diferentes pH;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

O biopolímero quitosana, grau de desacetilação 89,87%, foi fornecido pela Purifarma, Brasil. O corante carmim de cochonilha em solução amoniacal (padrão CC-300-WS-CHL) foi fornecido pela Christen – Hansen Ind. & Com. Ltda. Todos os outros reagentes utilizados são de grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Determinação do Grau de Desacetilação da Quitosana (%GD)

O teor dos grupos aminos presentes na quitosana foi determinado através de titulação condutimétrica, usando o método de Raimond et al. (1993), que consiste na dissolução da quitosana (200 mg) na presença de 20 mL de HCl 0,3 mol.L⁻¹, sendo em seguida diluído com 200mL de água destilada para uma boa dispersão do polímero na solução.

A titulação ocorreu com NaOH 0,1 mol.L⁻¹, através de adições de 0,2 mL de titulante, até o volume de 135 mL. A titulação condutimétrica foi realizada em triplicata utilizando-se um titulador automático da marca Schott Gerate, modelo T80/20 e um condutivímetro da marca Mettler Toleo, modelo MC 226.

3.2.2 Espectro Eletrônico UV-VI para o Corante Carmim de Cochonilha

O comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) do corante carmim de cochonilha foi determinado a partir do espectro de absorção, Shimadzu UV-Vis modelo 1203, das soluções do corante e onde foi medindo a absorbância na faixa de 400 a 700 nm.

3.2.3 Preparação das Microesferas de Quitosana

A quitosana (6,0 g) foi dissolvida em 200 mL de ácido acético 5% (m/v). A solução viscosa obtida foi gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica, Ismatec Reglo modelo 78016-30, sobre um banho de precipitação contendo solução de NaOH 2,0 mol/L. As microesferas gelificadas foram lavadas com água destilada até meio neutro e secas a temperatura ambiente.

3.2.4 Efeito do pH na Adsorção do Corante nas Microesferas de Quitosana

Microesferas de quitosana (150 mg) foram colocadas em contato com soluções individuais do corante carmim de cochonilha na concentração inicial de 400 mg.L^{-1} (C_o). Na faixa de pH 6 – 10. As soluções do corante foram preparadas em cada tampão utilizado, sendo de pH 6 - 8 solução de fosfato de sódio monobásico e pH 9 - 10 solução de tris(hidroximetil)-aminometano, e após o contato com as microesferas, estas foram transferidas para uma Encubadora Mini Shaker da marca Marconi, modelo MA 832 e agitadas durante 2 horas, a 150 rpm. O sobrenadante de cada frasco foi separado por filtração, e uma alíquota de 3,0 mL foi retirada e analisada por espectroscopia de UV-Vis, sendo a concentração do corante no sobrenadante determinada utilizando-se uma curva de calibração e a quantidade de corante adsorvida determinada empregando-se a equação 1:

$$q = \frac{(C_o - C_e) \cdot V}{W} \quad (\text{Equação 1})$$

onde, q é a quantidade de corante adsorvido no polímero (mg/g), V é o volume da solução (L), W é a massa de microesferas de quitosana utilizada (g), C_o é a concentração inicial da solução de corante (mg.L^{-1}) e C_e é a concentração de corante em equilíbrio na solução (mg.L^{-1}).

3.2.5 Microencapsulação do Corante Carmim de Cochonilha com Quitosana

A microencapsulação do carmim de cochonilha com quitosana foi realizada a partir dos seguintes métodos: i) impregnação do corante em microesferas e ii) coacervação do corante (ou separação de fases).

3.2.5.1 Impregnação do Corante em Microesferas de Quitosana

O corante carmim de cochonilha foi impregnado em microesferas de quitosana através da técnica de adsorção por contato. Por este método 100 mg do corante foram dissolvidos em solução tampão 0,1 mol. L⁻¹ e pH 7,0; sendo esta solução resultante colocada em contato com as microesferas de quitosana por 24 horas a 25 °C, sob agitação. Após o contato, as microesferas foram lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante e em seguida secas a temperatura ambiente.

3.2.5.2 Coacervação do Corante em Microesferas de Quitosana

Pela técnica de separação de fases ou coacervação foi preparada uma amostra na seguinte proporção de quitosana/corante: 1:1 em solução de ácido acético 5%. A solução polimérica contendo o corante foi gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica Ismatec Reglo, modelo 78016-30, sobre uma solução de NaOH 2,0 mol.L⁻¹. As microesferas formadas foram lavadas até pH 7,0 e secas a temperatura ambiente.

3.2.6 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho foram obtidos na região de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ com um espectrofotômetro FT Perkin Elmer – modelo 16 PC, utilizando-se pastilhas de KBr.

3.2.7 Morfologia das Microesferas

A morfologia interna e externa, porosidade e tamanho médio das microesferas de quitosana pura e das microesferas contendo o corante carmim de cochonilha, foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura, marca Philips, modelo XL 30, do laboratório de Materiais (LabMat) do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina. As amostras foram colocadas em estabes, recobertas com ouro e micrografadas. O diâmetro médio de cada amostra foi obtido a partir de uma população de microesferas, utilizando-se medidas dos diâmetros dos eixos vertical e horizontal. Para todas as amostras foram analisados cortes transversais, para avaliar as características internas da amostra.

3.2.8 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises foram efetuadas sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min e velocidade de aquecimento de $10 \text{ }^{\circ}\text{C/min}$, com o objetivo de avaliar as variações de massa em função da temperatura. As amostras foram analisadas utilizando-se um Analisador Termogravimétrico Shimadzu 50.

3.2.9 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As amostras foram analisadas sob atmosfera de nitrogênio, com taxa de aquecimento de 10 °C/min na faixa de temperatura de 25°C a 400°C, com a finalidade de avaliar interações entre polímero/corante, utilizando-se um Analisador Shimadzu DSC 50.

3.2.10 Estudo de Liberação do Corante em Função do pH

Amostras (75,0 mg) de microesferas de quitosana contendo o corante, obtidas através dos métodos de impregnação e coacervação, foram colocadas em 25,0 mL de solução tampão pH 1,0 (HCl 0,1 mol.L⁻¹), 2,0 (HCl 0,1 mol.L⁻¹), 3,0 (CH₃COOH 0,1 mol.L⁻¹), 4,0 (CH₃COOH 0,1 mol.L⁻¹) e 5,0 (CH₃COOH 0,1 mol.L⁻¹), sendo o pH destas soluções ajustado com a adição de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ e mantidas sob agitação constante (150 rpm) em banho termostatizado a 25,0 ± 0,1°C. Em intervalos de tempo pré-determinados, uma alíquota de 3,0 mL de cada solução foi retirada e analisada no comprimento de onda máximo do corante, $\lambda_{\text{máx}}$ 521 nm. Depois das leituras a solução foi devolvida ao erlenmeyer.

A porcentagem de corante liberada foi determinada usando uma curva de calibração que relaciona a absorbância com a concentração de corante conhecida (mg%) no mesmo tampão em que ocorreu a cinética, sendo que o experimento foi realizado em triplicata para cada pH. O estudo de liberação foi realizado até completa dissolução das microesferas com a liberação de todo o corante microencapsulado.

3.2.11 Determinação do Grau de Intumescimento

A determinação do grau de intumescimento foi realizada em soluções tampão de pH 1,0 (HCl 0,1 mol.L⁻¹), 2,0 (HCl 0,1 mol.L⁻¹), 3,0 (CH₃COOH 0,1 mol.L⁻¹), 4,0 (CH₃COOH 0,1 mol.L⁻¹) e 5,0 (CH₃COOH 0,1 mol.L⁻¹), sendo o pH destas soluções ajustado com a adição de NaOH 0,1 mol.L⁻¹. Inicialmente as microesferas impregnadas e coacervadas secas (500 mg cada) foram pesadas e mantidas nos diferentes tampões (50 mL) a 25 °C sob agitação de 100 rpm em um banho termostatizado Shaker Bath, da marca Lab Lin. Em intervalos de tempo pré-determinados as amostras eram retiradas das soluções tampões, secas em papel toalha para retirada do excesso de solução e pesadas novamente. Até peso constante. O grau de intumescimento de cada amostra no tempo t, foi determinado pela equação 2:

$$(\%) \text{ GI} = \frac{W_t - W_o}{W_o} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

onde W_t e W_o , referem-se aos pesos das amostras no tempo t e no estado seco, respectivamente. O experimento foi realizado em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do Grau de Desacetilação da Quitosana

Uma das propriedades que podem auxiliar na definição do polímero como quitina ou quitosana, é o grau de desacetilação. Arbitrariamente, o grau de desacetilação $\geq 60\%$ define o material polimérico como quitosana (TAN et al., 1998).

Vários métodos são descritos na literatura para determinação do grau de desacetilação da quitosana, sendo a titulação condutimétrica o método escolhido em função da sua simplicidade e precisão. Nesta titulação utiliza-se excesso de HCl, ocorrendo a protonação dos grupos amino da quitosana.

A curva dos valores de condutância, k , versus volume de titulante apresenta dois pontos de inflexão (Figura 3), ou seja, dois pontos de equivalência, sendo o primeiro correspondente à neutralização de HCl que está em excesso.

A diferença entre os dois pontos de equivalência corresponde ao volume de base requerida para neutralizar os grupos amino do polímero.

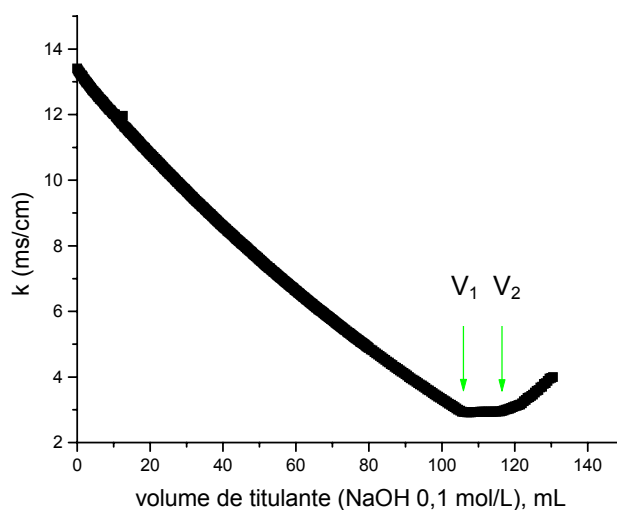


Figura 3 – Curva de titulação condutimétrica da quitosana.

A porcentagem de grupos aminos livres (%GD) foi calculada pela equação 3:

$$\%GD = \frac{M(V_2 - V_1)161}{W} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

onde M é a concentração da solução de NaOH em mol.L⁻¹, V₁ (105 mL) e V₂ (116,5 mL) são os volumes de NaOH em mL, empregados para neutralizar o excesso de ácido clorídrico e a quitosana, 161 é a massa de uma unidade monomérica de quitosana e W é a massa em mg empregada na titulação. O grau de desacetilação calculado foi de 89,87%, valor este que representa a média de três determinações. Este resultado mostra o alto grau de desacetilação do polímero em estudo.

4.2 Espectro UV-Visível para o Corante Carmim de Cochonilha

A Figura 4 ilustra o espectro do corante carmim de cochonilha e seu respectivo comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$). A partir do espectro de absorção da solução do corante, no qual se mediu a absorbância na faixa de 400 a 700 nm, o valor de $\lambda_{\text{máx}}$ foi determinado em 521 nm para solução ácida, 522 nm para solução aquosa e 530 nm para o meio básico, entretanto, como pode-se notar não é possível diferenciá-los por esta técnica.

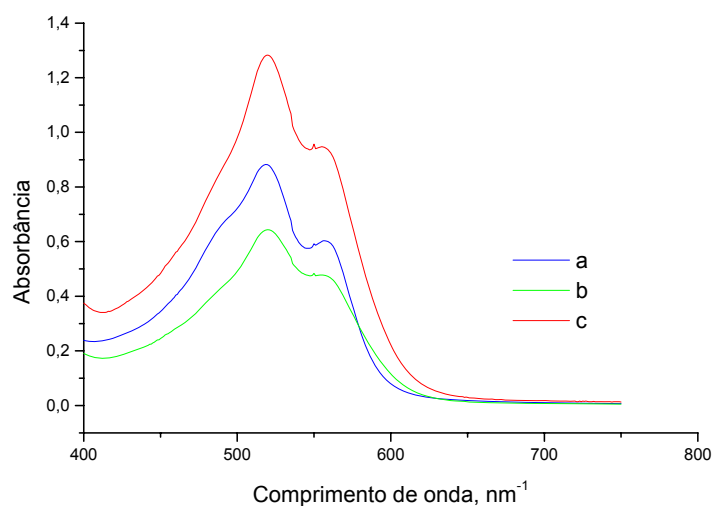


Figura 4 – Espectro de UV-VIS para o corante carmim de cochonilha em soluções: a) ácida, b) aquosa e c) básica.

4.3 Dependência do pH na Adsorção do Corante Carmim de Cochonilha

Com o intuito de compreender o mecanismo de adsorção do corante carmim de cochonilha, estudou-se a adsorção deste corante utilizando-se microesferas de quitosana na faixa de pH 6 – 10 (Figura 5).

Sendo definida esta faixa de pH, pois a valores de pH baixos pode ocorrer a dissolução das microesferas, uma vez que a quitosana é solúvel em meio ácido e a precipitação do corante, pois o corante em meio ácido precipita. Desta forma observa-se que o melhor pH para encapsular o corante é o pH 7,0; onde a quantidade de corante adsorvido foi de 40,295 mg/g, como mostra a Figura 5.

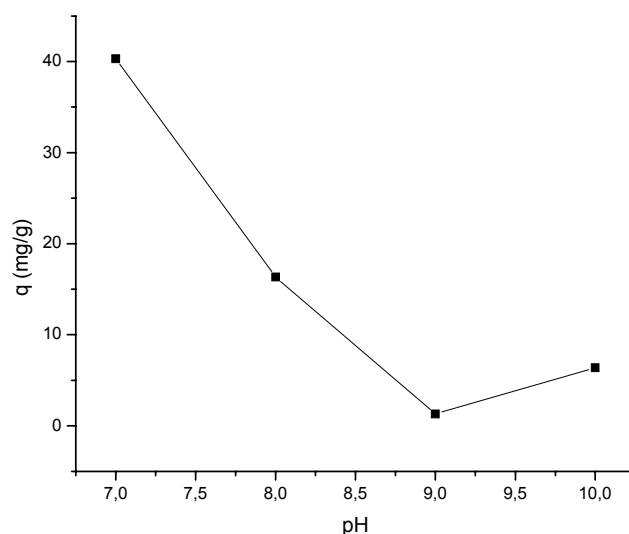


Figura 5 – Dependência do pH para a adsorção do corante carmim de cochonilha, utilizando microesferas de quitosana, $T = 25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, $C_0 = 400 \text{ mg/L}$, tempo de contato = 2 horas.

Na determinação da quantidade de corante adsorvido por grama de quitosana, em pH 6,0 ocorreu a precipitação do corante; sendo assim fornecendo um resultado falso sobre a quantidade de corante adsorvido.

4.4 Caracterização das Microesferas por Espectroscopia no Infravermelho (IV)

A Figura 6 apresenta os espectros de infravermelho do corante e das microesferas, com e sem corante preparadas pelos métodos de impregnação e coacervação.

O espectro de infravermelho da quitosana apresenta uma banda em 3436 cm^{-1} referente à banda de estiramento da ligação --OH enquanto que as bandas em 2925 e 2867 cm^{-1} são bandas de estiramento C-H. As bandas em 1648 cm^{-1} e 1546 cm^{-1} referem-se ao estiramento C=O de amida secundária e as vibrações de deformação N-H de amina primária, respectivamente. A banda em 1381 cm^{-1} refere-se à pequena vibração da ligação C-H do grupo CH_3 referente ao grupo acetamido ainda presente na cadeia polimérica. A banda em 1076 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação C-O de álcool primário, Figura 6d.

O espectro de infravermelho do corante apresenta uma banda em 3418 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação --OH e a banda em 2948 cm^{-1} referente à banda de estiramento C-H do grupo CH_3 . As bandas em 1638 e 1409 cm^{-1} são devido à vibração dos grupos carbonilas contido no corante.

Nos espectros das amostras contendo o corante observa-se pequenos deslocamentos dos picos, sendo interpretado como possíveis interações entre polímero e corante.

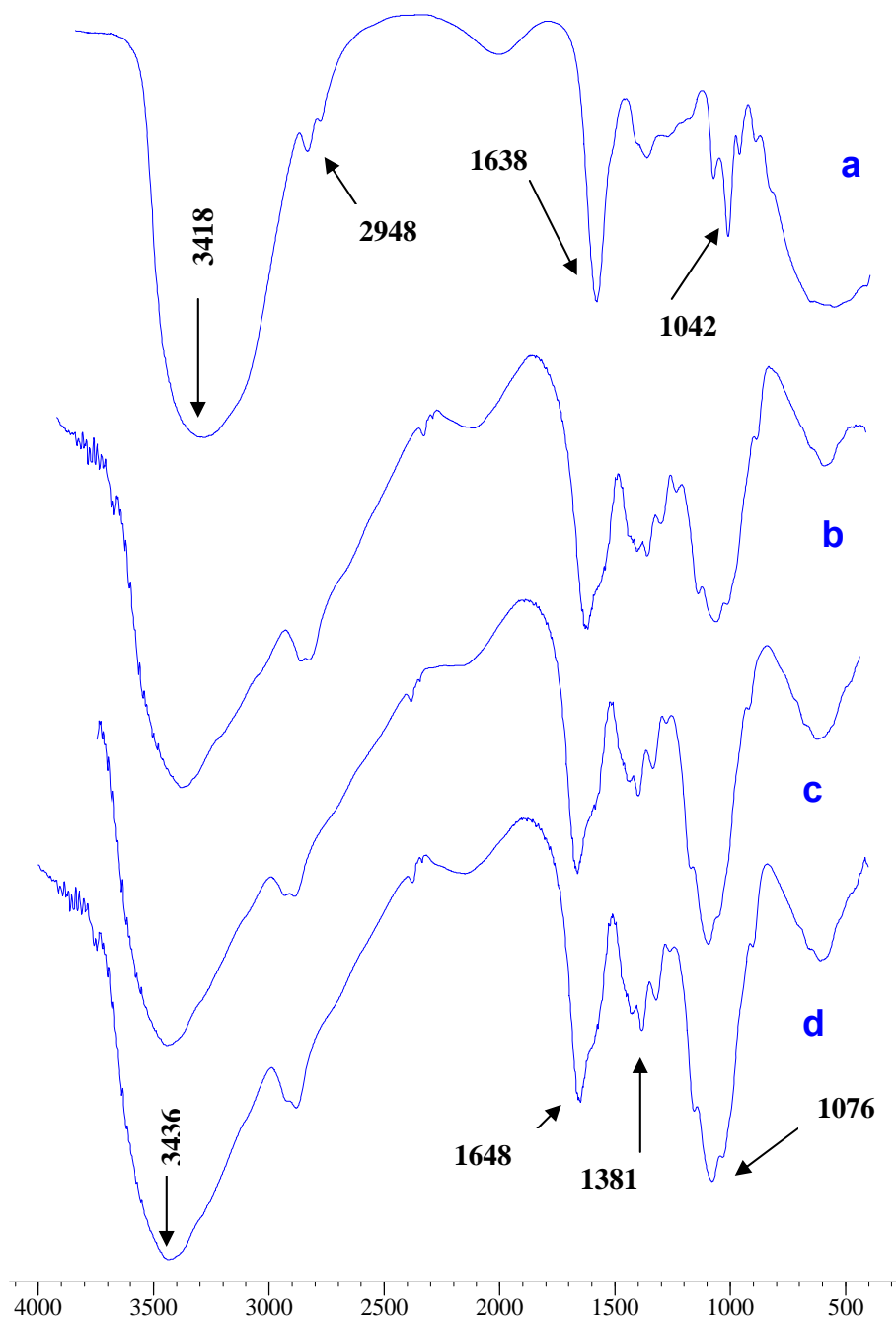


Figura 6 – Espectro de infravermelho, em pastilhas de KBr :a) corante, b) microesferas coacervada, c) microesfera impregnada e d) microesfera de quitosana.

4.5 Análise da Morfologia das Microesferas Utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura fornece informações sobre as características morfológicas das microesferas, tais como a presença de fissuras e poros, permitindo uma análise rápida e direta da eficiência do processo de encapsulação. A presença de fissuras e rachaduras na superfície das microesferas pode comprometer a proteção oferecida ao encapsulado. Pode-se também, verificar a partir do MEV, a homogeneidade do tamanho das microesferas formadas (MUZZARELLI et al., 2004).

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram reveladas a partir de uma população mista de microesferas, algumas contendo boa esfericidade. As microesferas foram caracterizadas morfolologicamente incluindo a distribuição e tamanho das partículas.

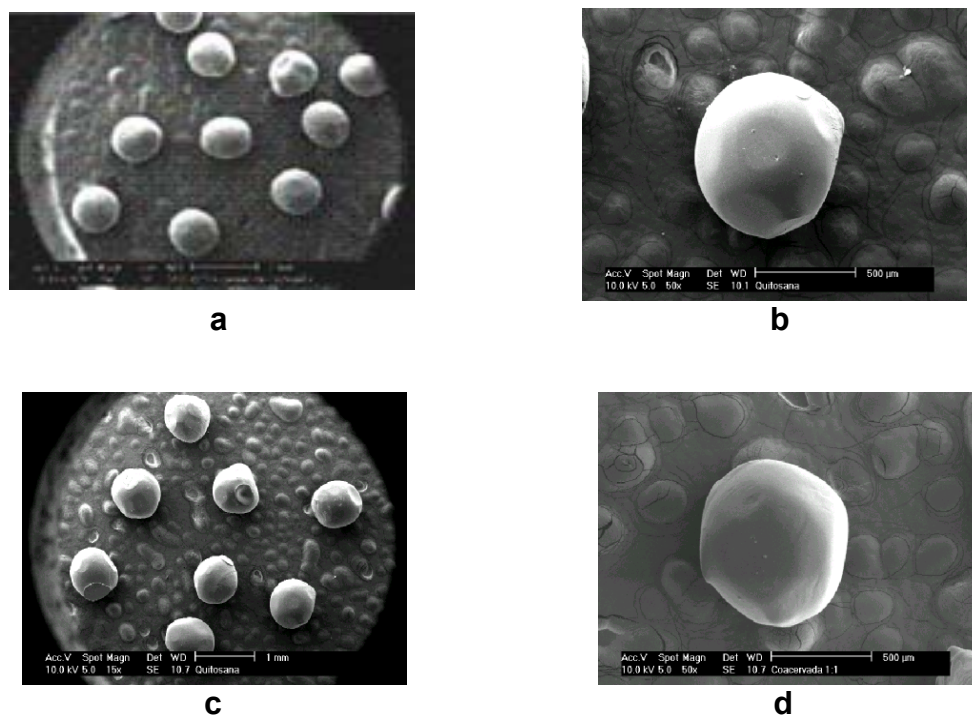


Figura 7 – Microencapsulação eletrônica de varredura das microesferas: a) população de microesferas de quitosana; b) microesfera de quitosana; c) população de microesfera impregnada e d) microesfera de quitosana coacervada.

O perfil de distribuição do tamanho médio das partículas foi similar para todas as amostras de microesferas impregnada, coacervada e microesferas de quitosana pura.

O tamanho médio das microesferas foi obtido a partir da média de uma população de microesferas, ficando em 674 μm para amostra sem corante, 739 μm para a amostra impregnada e de 762 μm para amostra coacervada, sendo observado boa esfericidade, ausência de poros e de rachaduras.

A morfologia interna das microesferas observada a partir de cortes transversais nas amostras contendo o corante, mostram uma estrutura interna rígida, sem poros e fissuras (Figura 8).

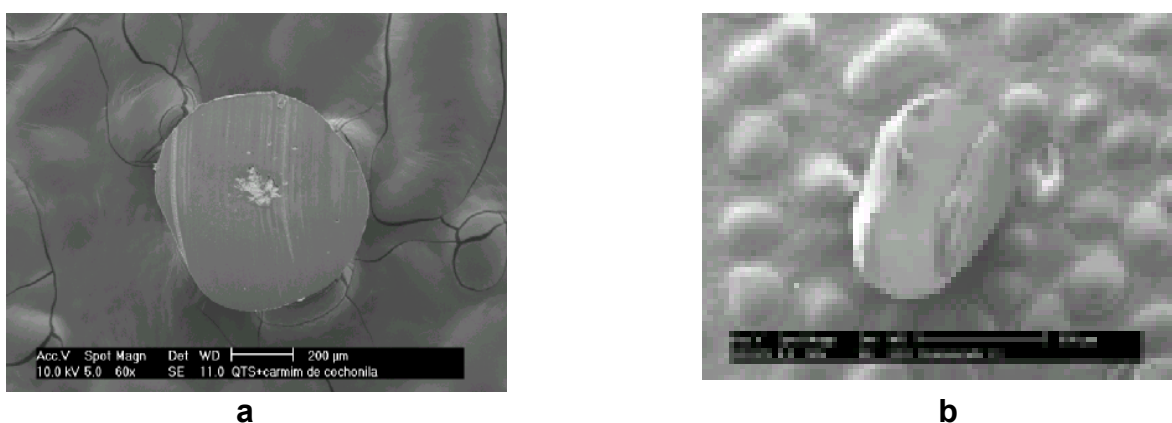


Figura 8 – Secções transversais nas microesferas de quitosana contendo o corante carmin de cochonilha: a) impregnada e b) coacervada.

As análises da micrografia das microesferas contendo o corante revelam uma encapsulação eficiente sugerindo que o corante está dissolvido na matriz polimérica.

4.6 Análise Termogravimétrica (TGA) das amostras de Microesferas de Quitosana

A termogravimetria é uma técnica que se baseia na medida de perda de massa de uma determinada amostra, em função da temperatura ou do tempo. Os

termogramas fornecem informações importantes sobre a estabilidade térmica do material analisado (SKOOG et al., 1991).

As microesferas de quitosana com e sem corante foram caracterizadas por análise termogravimétrica (TGA), cujo termograma é mostrado na Figura 9.

Observa-se para todas as amostras uma perda de massa na faixa de 50 – 100°C correspondente à perda de umidade livre. Este mesmo pico também foi observado nos estudos de degradação térmica de derivados de quitosana por Qu et al. (2000b).

No termograma da quitosana observa-se também a presença de um pico de decomposição em 323,21°C referente à sua decomposição (Figura 9-a).

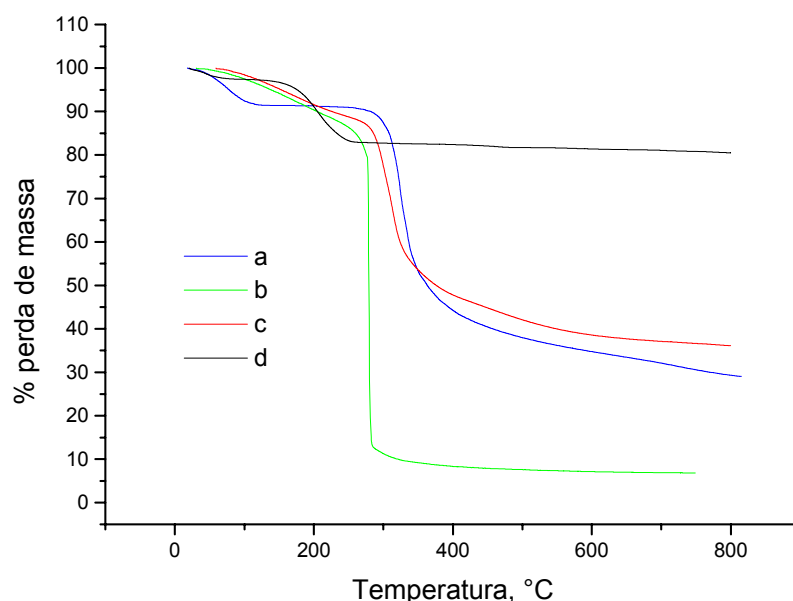


Figura 9 – Análise de TGA para as microesferas: a) quitosana, b) impregnada, c) coacervada e d) corante.

Outras perdas de massa são verificadas em: 278,66°C para as microesferas impregnadas; 300,28°C e 312,70°C para microesferas coacervadas (Figura 9-b e 9c, respectivamente). O corante puro apresenta pico de decomposição em 205,30°C.

O deslocamento de picos observado para as amostras contendo corante, sugere a existência de interações entre polímero e corante.

Os resultados obtidos indicam menor estabilidade térmica das amostras com corante quando comparadas com a amostra de quitosana pura.

A análise das microesferas impregnadas também mostrou a presença de 7,1222% de resíduo final, sugerindo ser uma amostra biodegradável.

4.7 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) das Amostras de Microesferas de Quitosana

A técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi empregada para examinar possíveis interações entre a matriz polimérica e o corante.

A Figura 10 apresenta a análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) da quitosana, do corante, das microesferas impregnadas e das microesferas coacervadas.

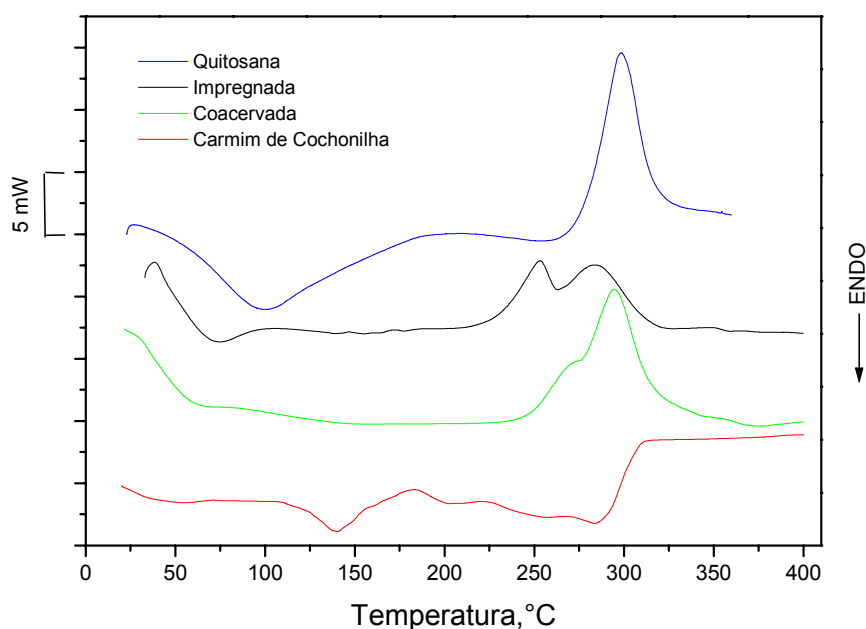


Figura 10 – Análise de DSC para as microesferas: a) -- quitosana, b) -- impregnada, c) -- coacervada e d) -- corante.

Observa-se para todas as amostras um pico endotérmico na faixa de 50-100°C correspondente ao processo de desumificação das amostras, Figura 10. No termograma da quitosana observa-se também a presença de um pico exotérmico

em torno de 300°C, correspondente a sua temperatura de decomposição, Figura 10a. Nos termogramas das amostras coacervadas e impregnadas o pico de degradação da quitosana aparece deslocado para temperaturas mais baixas: 294,46°C para a amostra coacervada e 283,91°C para a amostra impregnada, Figura 10b-c. Para o corante puro, observa-se um pico endotérmico em 140,33°C correspondente a sua temperatura de fusão, Figura 10d. A presença do corante na amostra coacervada e impregnada é evidenciado pelos picos observados nos termogramas destas amostras em 253,18°C para a amostra impregnada e 273,44°C para a amostra coacervada, Figura 10b-c.

Os deslocamentos de picos observados nos termogramas das amostras contendo o corante sugerem a presença de uma interação entre o polímero e o corante. Observa-se uma diminuição significativa do pico atribuído ao corante no termograma da amostra coacervada sugerindo uma interação mais significativa entre polímero e corante para estas amostras, quando comparadas com as amostras impregnadas.

Estes resultados mostram ainda uma menor estabilidade térmica das amostras contendo corante quando comparadas com a amostra de quitosana pura. Por outro lado, no termograma das amostras contendo o corante observa-se que o corante degrada a temperaturas mais altas em relação ao corante puro.

4.8 Estudo de Liberação Controlada do Corante Carmim de Cochonilha em Função do pH

A quantidade de corante carmim de cochonilha liberado com o tempo (M_t) foi determinado pelo monitoramento do meio de liberação em 521 nm, em um espectrofotômetro UV-Vis. A quantidade total de corante liberado (M_∞) foi obtida, após manter as microesferas por algumas horas em solução.

O aspecto geral da curva de liberação do carmim de cochonilha é mostrado na Figura 11, o qual mostra um gráfico da fração de corante liberado ($M_t/M_\infty \times 100$) em função do tempo, onde M_t é a quantidade de corante liberado no tempo t e M_∞ é a quantidade de corante liberado no tempo infinito.

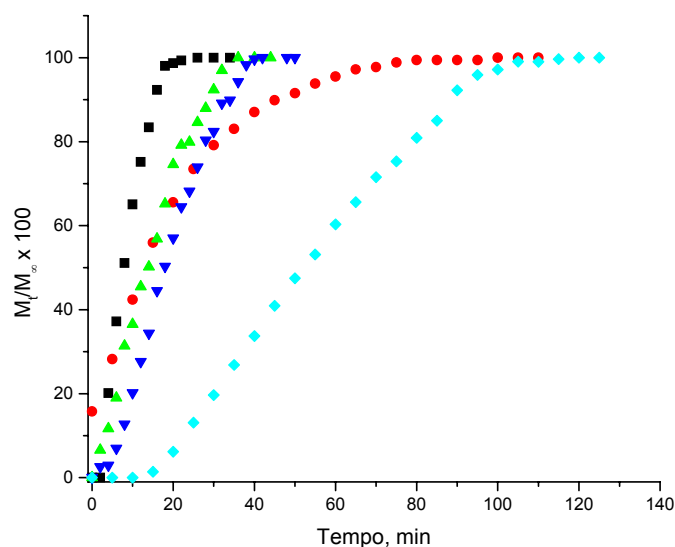


Figura 11 – Perfil de liberação do corante carmim de cochonilha para as microesferas impregnadas a 25°C: (■) pH = 1,0; (●) pH = 2,0; (▲) pH = 3,0; (▼) pH = 4,0 e (◆) pH = 5,0.

Observa-se que todo o corante é liberado a partir da matriz polimérica de quitosana em menos de uma hora considerando-se os pH 1,0; 2,0 e 3,0. Para os pH 4,0 e 5,0 o tempo de liberação do corante foi de 80 e 100 minutos, respectivamente. Observa-se através do gráfico da Figura 11, que conforme há um aumento de pH a liberação torna-se mais lenta.

Uma velocidade mais rápida da liberação do corante carmim de cochonilha microencapsulado pelo método de coacervação é observada quando comparada com o método de impregnação, sendo o perfil de liberação para as microesferas coacervadas na proporção 1:1 (quitosana/corante), mostrado na Figura 12.

O corante foi liberado a partir das microesferas coacervadas em menos de duas horas. A liberação mais rápida ocorreu a pH 1,0; enquanto que a mais lenta ocorreu em pH 5,0. A liberação para as microesferas coacervadas é imediata quando há contato das microesfera com o tampão, como mostra a Figura 12, uma vez que o intumescimento, para as mesmas, não é tão significativo.

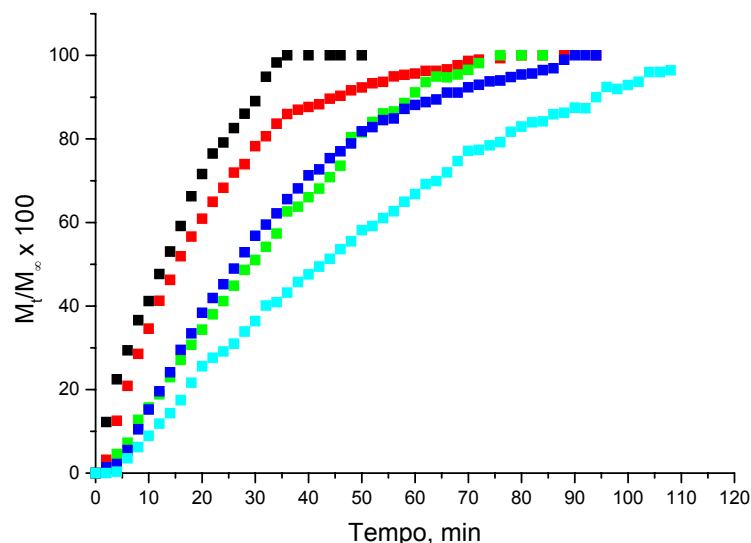


Figura 12 – Perfil de liberação do corante carmim de cochonilha para as microesferas coacervadas a 25°C: (■) pH = 1,0; (■) pH = 2,0; (■) pH = 3,0; (■) pH = 4,0 e (■) pH = 5,0.

4.9 Determinação do Grau de Intumescimento (GI)

A penetração gradual de água em um polímero ocasiona um aumento gradual no tamanho do mesmo com a formação de um gel hidratado, permitindo que qualquer material aprisionado no polímero possa dissolver-se através do mesmo (MUNDAY & COX, 2000; KHARE & PEPPAS, 1995).

A Tabela 1 apresenta os valores de GI obtidos para todas as amostras nos diferentes pH, em um período de 40 minutos.

Tabela 1 – Grau de intumescimento das diferentes amostras de microesferas de quitosana contendo corante carmim de cochonilha

Grau de Intumescimento para as Microesferas					
Impregnada			Coacervada		
pH	Tempo*	Grau	pH	Tempo*	Grau
1	4	7,04	1	6	2,04
2	12	11,85	2	4	1,43
3	10	80,42	3	8	2,64
4	14	58,63	4	8	3,00
5	31	35,57	5	10	3,02

* Tempo para a obtenção de microesferas de massa constante (minutos)

A partir da Tabela 1, pode-se observar que as microesferas impregnadas requerem um maior tempo para intumescerem, observando-se para essas amostras um alto valor de intumescimento. O mesmo não ocorre para as microesferas coacervadas, uma vez que o grau de intumescimento não é tão significativo para as mesmas.

4.10 Análise do Mecanismo de Liberação para o Corante Carmim de Cochonilha a partir de Microesferas de Quitosana

Recentemente, muitos são os esforços para elucidar o mecanismo de liberação de núcleos ativos a partir de matrizes hidrofílicas (FERRERO et al., 2000; ROY & ROHERA, 2002; LLABOT et al., 2004; POPA et al., 2000). Sendo assim as cinéticas de liberação tem se tornado alvo para entender o processo de liberação.

A literatura tem mostrado que a liberação de solutos a partir de matrizes hidrofílicas é uma interação complexa entre intumescimento, difusão, erosão e relaxação (HARLAND et al., 1988). Portanto, na prática, matrizes poliméricas geralmente liberam o soluto via combinação de vários mecanismos (PEPAS & SAHLIN, 1989).

A partir da linearização da equação 4, obtida através do gráfico de $\ln \mathbf{Mt/M_{\infty}}$ em função de $\ln \mathbf{t}$, obtém-se o expoente difusional \mathbf{n} .

$$\mathbf{Mt/M_{\infty} = k' \cdot t^n} \quad (\text{equação 4})$$

onde $\mathbf{Mt/M_{\infty}}$ é a fração do corante liberado no tempo \mathbf{t} , $\mathbf{k'}$ é uma constante que incorpora características da matriz polimérica e do soluto e \mathbf{n} é o coeficiente difusional (RITGER & PEPPAS, 1987a).

De acordo com os critérios para cinética de liberação de solutos a partir de sistemas intumescíveis com geometria esférica, um valor do expoente de liberação de $\mathbf{n} > 0,85$ indicando que o mecanismo de liberação observado é um super Caso II de transporte, no qual ocorre a contribuição simultânea de processos como difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica (RITGER & PEPPAS, 1987a e 1987b; SIEPMANN & PEPPAS, 2001).

Os valores de \mathbf{n} para a liberação do corante carmim de cochonilha a partir de microesferas de quitosana impregnadas e coacervadas, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Coeficiente difusional \mathbf{n} para a liberação do corante carmim de cochonilha a partir de microesferas de quitosana impregnada e coacervada.

Impregnada			Coacervada		
pH	n	r	pH	n	r
1	1,2777	0,9960	1	0,7436	0,9985
2	0,6134	0,9994	2	1,2118	0,9801
3	1,0825	0,9956	3	0,9436	0,9986
4	1,5328	0,9801	4	1,1947	0,9951
5	2,6329	0,9714	5	1,2119	0,9885

Observa-se a partir da Tabela 2 que os valores de \mathbf{n} ficaram em geral acima de 0,85 sugerindo um mecanismo do tipo super Caso II de transporte.

Neste mecanismo a cadeia polimérica inicialmente se arranja (intumescimento e relaxação) para, em seguida, permitir o processo de difusão. (LLABOT et al., 2004; SIEPMANN et al., 1999).

Observou-se a partir da Tabela 1, que as microesferas impregnadas apresentam um alto grau de intumescimento na faixa de 7 - 80%, sugerindo que este processo deve predominar durante a liberação do corante. Visualmente, observa-se que estas microesferas incham quando em contato com a solução tampão. Já as microesferas coacervadas apresentaram um baixo grau de intumescimento, entre 1 a 3%, sendo observado uma diminuição gradativa das microesferas à medida que o corante é liberado, sugerindo que a “erosão” das microesferas deve predominar durante a liberação do corante.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após os estudos de microencapsulação e liberação controlada do corante carmim de cochonilha utilizando microesferas de quitosana pode-se considerar que:

- As microesferas de quitosana apresentaram uma porcentagem de grupos amino livre (%GD) de 89,87%;
- Através dos métodos de impregnação e coacervação, obtêm-se os produtos de microencapsulação, sendo que os mesmos apresentaram-se sem poros ou fissuras a partir de MEV e visualmente;
- Nos espectros de infravermelho, observa-se nas amostras contendo o corante pequenos deslocamentos dos picos, sendo interpretado como possíveis interações entre polímero e corante;
- Os dados das análises termogravimétricas (TGA e DSC) indicam uma menor estabilidade térmica das amostras com o corante, as quais apresentam temperatura de decomposição ligeiramente menor que as microesferas de quitosana pura;
- As cinéticas de liberação em diferentes pH, para as amostras impregnadas e coacervadas; indicam que a liberação do corante torna-se mais lenta conforme a um aumento de pH;
- Na liberação do corante frente ao efeito do pH, a amostra coacervada mostra uma maior velocidade de liberação do corante, em relação à amostra impregnada;
- Neste estudo observa-se que o mecanismo de liberação para o corante natural carmim de cochonilha a partir de microesferas de quitosana é do tipo super Caso II de transporte;
- A microencapsulação do corante natural carmim de cochonilha com o biopolímero quitosana mostrou-se eficiente para os métodos de impregnação e coacervação, proporcionando ao corante melhor solubilidade em pH ácido, tendo em vista que o corante puro precipita neste meio.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARUONA, O.I., **Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods.** Mutation Research, 523 – 524, 9 – 20, 2003.

ATKINS, P.W., **Physical chemistry**, Oxford University Press. 5ª ed., 985 – 995, 1993.

BAKAN, J.A., **Microencapsulation of food and related products**, Food Technology, v.27, n.11, p.34 – 44, 1973.

BENITA, S., **Microencapsulation methods and industrial application**, New York: Marcel Dekker Inc., 1996.

BRANNON-PEPPAS, L., **Controlled release in the food and cosmetic industries.** In: M.A. El-Nokay, D.M. Piatt, and B.A. Charpentier (Eds.), ACS symposium series no. 520, Washington, DC. P. 42 – 45, 1993.

CHANDY, T.; SHARMA, C.P., **Chitosan - as a biomaterial biomater.** Artif. Cells Artif. Organs 18, 1–24, 1990.

CHIOU, M.S.; LI, H.Y., **Equilibrium and kinetic modeling of adsorption of reactive dye on cross-linked chitosan beads**, Journal of Hazardous Materials, B93, 233 – 248, 2002.

COLLINS, P.; PLUMBLY, J., **Natural colors: stable future?** Food Tech Europe, v.49, n.2, p. 64 - 70, 1995.

CONSTANT, P.B.L.; STRINGHETA, P.C., **Microencapsulação de Ingredientes Alimentícios**, Bol. SBCTA, 36(1), 12 – 18, 2002.

DAMASCENO, V., **Corantes, Guerra aos sintéticos ressuscita os naturais.** Química e Derivados, 1988.

DEASY, P. B., **Microencapsulation and related drug process.** New York: Marcel Dekker Inc, 1984.

DZIEZAK, J.D., **Microencapsulation and Encapsulated Ingredients**, Food Technology, 42, 136 – 151, 1988.

EISNER, T.; ZIEGLER, R.; McCORNICK, J.L.; EISNER, M.; HOEBECKE, E.R.; MEINWALD, J., **Experientia** 50, 610, 1994.

ENGELHARDT, J., **Annatto: the natural colour of choice in the modern food industry**, Natural Food Colours Association, Basle, Switzerland, *Natcol Quaterly Information Bulletin*, 2, 4 –10, 1988.

FERRERO, C.; MUÑOZ-RUIZ, A.; JIMÉNEZ-CASTELLANO, M.R., **Fronts movements as a useful tool for hydrophilic matrix release mechanism elucidation**, *Int. J. Pharm.* 202, 21 – 28, 2000.

FRANCIS, F.J., **Colorants**. Minnesota: Eagan Press, 145 p. (Eagan Press Handbook Series), 1999.

_____, F.J., **Food Colorants: Anthocyanins**. *Critical. Food Science and Nutriton*, v. 28, p. 273 – 314, 1989.

_____, F.J., **Less common natural colorants**. In: HENDRY, G.A.F; HOUGHTON, J.D. *Natural food colorants*. 2nd ed. Glasgow: Blackie Academic and Professional, p. 310-335, 1996.

FREUND, P.R.; WASHAN, C.J.; MAGGION, M., **Natural color for use in foods**. *Cereal Foods World*, v.33, n.7, p.553-559, 1988.

FUKUDA, H., **Polyelectrolyte complexes of chitosan carboxymethyl cellulose**. *Bull. Chem. Soc. Jpn* 53, 837–840, 1980.

GRIFFIN, W.C., **Solid essential oil concentrate and process of preparing the same**. US patent 2, 556, 410, 1951.

GUIBAL, E., **Interactions of metals ions with chitosan-based sorbents: a review**, *Separation and Purification Technology*, v. 38, 43 – 74, 2004.

HANAFI, M.M.; ELTAIB, S.M.; AHMAD, M.B., **Physical and chemical characteristics of controlled release compound fertiliser**. *European Polymer Journal* 36:2081 – 2088, 2000.

HARLAND, R.S.; GAZZANIGA, A.; SANGALLI, M.E.; COLOMBO, P.; PEPPAS, N.A., **Drug: polymer matrix swelling and dissolution**. *Pharm. Res.* 5 (8), 488 – 494, 1998.

HENRY, B.S. **Natural food colours**. In: HENDRY, G.A.F; HOUGHTON, J.D. **Natural food colorants**. 2nd ed. Glasgow: Blackie Academic e Professional, p.40 - 79, 1996.

KAS, H.S., **Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate systems**. *J. Microencapsul* 14, 689–711, 1997.

KHARE, A.R.; PEPPAS, N.A., **Swelling / deswelling of anionic copolymer gels**, *Biomaterials*, 16, 559 – 567, 1995.

KING, A.H., **Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing hidrocolloids.** In: RISH, S.J.; REINECCIUS, G.A., *Encapsulation and controlled release of food ingredients*, Washington, DC: 1995, 8 – 25, 1995.

LLABOT, J.M.; MANZO, R.H.; ALLEMANDI, D.A., **Drug release from carbomer: carbomer sodium salt matrices with potencial use as mucoadhesive drug delivery system**, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 276, 59 – 66, 2004.

MILES, J., **Encapsulation and delivery of perfumes and fragrances.** Second workshop on controlled delivery in consumer products. Secaucus, NJ: Controlled Release Society, 1992.

MILIANE, C.; ROMANI, A.; FAVARO, G., **Phys. Org. Chem.** **13**, 141, 2000.

MUNDAY, D.L.; COX, P.L., **Compressed xanthan and karaya gum matrices hydration, erosion and drug release mechanisms**, *Int. J. Pharm.*, 203, 179 – 192, 2000.

MUZZARELLI, C.; STANIC, V.; TOSI, G.; MIZZARELLI, R.A.A., **Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and charecterisation of the microspheres**, *Carbohydrate Polymers*, 57, 73 – 82, 2004.

_____, R.A.A., **Chitin**, Oxford: Pergamon Press, 1977.

PEPPAS, N., **Diffusional release from polymeric carriers.** Second workshop on the controlled delivery in consumer products. Secaucus, NJ: Controlles release Society, 1992.

_____, N.A.; SAHLIN, J.J., **A simple equation for description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation.** *Int. J. Pharm.* 57, 169 – 172, 1989.

POPA, M.I.; AELENEI, N.; POPA, V.I.; ANDREI, D., **Study of the interactions between polyphenolic compounds and chitosan**, *Reactive & Functional Polymers*, v. 45, 35 – 43, 2000.

POTHAKAMURY, U.R.; BARBOSA – CANOVÁS, G.V., **Trends in food Sci & technology**, 6, 1995.

QU, X.; WIRSEN, A.; ALBERTSON, A.C., **Effect of lactic/glycolic acid side chains on the thermal degradation kinetics of chitosan derivates**, *Polymer*, v. 41, 13, 4841 – 4847, 2000b.

RAMAKRISHNA, K.R.; VIRARAGHAVAN, T., **Dye removal using low cost adsorbents**, Water Sci. Tech., v. 36, 189 – 196, 1997.

RAO, K.C.L.N.; ASHUTOSH, K.K., **Color removal from a dyestuff industry effluent using activated carbon**, J. Chem. Tech., v.1, 13 –13, 1994.

RAYMOND, L.; FREDRICK, G.M.; MARCHESSAULT, R.H., **Degree of deacetylation of chitosan using conductimetric titration and solid state NMR**, Carbohydrate Research, v.246, p. 331 - 336, 1993.

_____, L.; FREDRICK, G.M.; MARCHESSAULT, R.H., **Degree of deacetylation of chitosan using conductimetric titration na solid state NMR**, Carbohydrate Research, v. 246, p. 331 – 336, 1993.

RISH, S.J., **Encapsulation: overview of uses and techniques**, In: RISH, S.J.; REINECCIUS, G.A., Encapsulation and controlled release of food ingredients, Washington, DC: p. 8 – 25, 1995.

RITGER, P.L.; PEPPAS, N.A., **A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs**, Journal of Controlled Release, 5, 23 – 36, 1987a.

_____, P.L.; PEPPAS, N.A., **A simple equation for description of solute release. II. Fickian and Anomalous release from Swellable Devices**, Journal of Controlled Release, 5, 37- 42, 1987b.

ROBERTS, G.A.F., **Chitin Chemistry**, Macmilla, London, 1992.

ROY, D.S.; ROHERA, B.D., **Comparative evaluation of rate of hydration and matrix erosion of HEC and, HPC, and study of drug release from their matrices**. Eur. J. Pharm. Sci. 16, 193 – 199, 2002.

SANFORD, P.A.; HUTCHINGS, G.P., **CHITOSAN – A natural cationic biopolimer comercial applications**, In: YALPINI, M., Industrial polysaccharides: genetic engineering structure / property relations and applications, p. 363 – 637, 1997.

SANTOS, A.B.; FERREIRA, V.P.; GROSSO, C.R.F., **Microcápsulas – Uma alternativa viável (Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação: óleo – resina de páprica)**, Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, nº16, ano 3, 26 – 30, 2000.

SCHUL, J., **Natural food colorants science and technology**, New York: Marcel Decker Inc, p. 1 – 10, 2000.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J.K.V.; JEON, Y.J., **Food Applications of Chitin and Chitosan**, Trends in Food Science & technology, 10, 37 – 51, 1999.

_____, F.; HAN, X.Q., **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, n.6, p. 501 – 547, 1995.

_____, F.; HAN, X.Q., **Encapsulation of Food Ingredients**, Critical Review in Food Science and Nutrition, 33, 6, 501 – 547, 1993.

SIEPMANN, J.; LECOMTE, F.; BODMEIER, R., **Diffusion controlled drug delivery systems: calculation of the required composition to achieve desired release profiles**, J. Control. Re., 60, 379 – 389, 1999.

_____, J.; PEPPAS, N.A., **Modeling of drug delivery systems based on hydroxypropyl methycellulose (HPMC)**, Advanced Drug Delivery Reviews, v. 48, 139 – 157, 2001.

SINHA, V.R.; SINGLA, A.K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S., **Chitosan microspheres as a potential carrier for drug**, International Journal of Pharmaceutics, v. 274, 1 – 33, 2004.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J., **Fundamental Of Analytical Chemistry**, 6^a ed., Forth Worth: Saunders College, 829 p., 1991.

STEPHANE A.D.; NETTO F.M.; LABUZA T.P., **Comparison of spray-drying, grum-drying and freeze-drying for β -carotene encapsulation and preservation**, Journal of Food Science 62:1158-1162, 1997.

STRINGHETA, P.C. et al., **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, 3, 1999.

TAN, C.S.; KHOR, E.; TAN, T.K.; WONG, S.M., **The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivate UV-spectrophotometry method of determination**. Talanta, v. 45, p. 713 – 719, 1998.

WHORTON, C.; REINECCIUS, G.A., **Evaluation of the machanism associated with the release of encapsulation flavor maetrial from maltodextrin matrices**, In: Encapsulation and controlled release of food ingredients. RISCH, S.J. & REINECCIUS, G.A.. Eds., American Chemical Society, Washington, DC, p. 143 – 160, 1995.

WU, F.C.; TSENG, R.L.; JUANG, R.S., **Enhanced abilities of highly swollen chitosan beads for color removal and trysinase immobilization**, J. Hazard. Mater., B81, 167 – 177, 2001a.

ZENG, X.F.; RUCKENSTEIN, E., **Cross-linked macroporous chitosan anion-exchange membranes for protein separations**, J. Membr. Sci., v. 148, 195 – 205, 1998.

ZOHURIAN, M.J.; SHOKROHALI, F., **Thermal studies on natural and modified gums**, Polymer Testing, v. 23, n° 5, 575 – 579, 2004.